云 南 植 物 研 究　2003，25（2）：223～229
Acta Botanica Yunnanica

转基因番木瓜作为抗结核植物口服疫苗的初步研究

张更林，周　鹏*，郭安平，沈文涛，黎小瑛
（中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室，海南 海口　571101）

摘要：转基因植物疫苗的研制，可改变传统的疫苗接种方式和接种手段，大大降低疫苗的生产成本，具有广阔的应用前景。结核病的泛滥使抗结核的免疫预防急需开发新型的疫苗，研制抗结核的转基因植物疫苗具有重大的理论和实践意义。本文对具有良好免疫原性的结核杆菌分泌蛋白ESAT-6基因，进行了修饰改造，构建了带潮霉素选择抗性基因的植物表达载体和根癌农杆菌工程菌；采用叶盘法转化热带水果番木瓜，获得了13株抗性植株，通过PCR、Southern blot和RNA dot blot分子检测，确认了4株为转基因植株。番木瓜ESAT-6转基因植株的获得，为进一步的结核病植物口服疫苗的免疫研究和新型抗结核疫苗的研制与开发奠定了基础。

关键词：转基因番木瓜；ESAT-6分泌蛋白；口服疫苗
中图分类号：S 668.2，Q 785　**文献标识码：**A　**文章编号：**0253－2700(2003)02－0223－07

An Initial Study of Transgenic *Carica papaya* Used as a Kind of Vaccine for Anti-*Tuberculosis*

ZHANG Geng-Lin，ZHOU Peng*，GUO An-Ping，SHEN Wen-Tao，LI Xiao-Ying
（*National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops*，*CATAS*，Haikou 571101，China）

Abstract：Oral vaccines produced by transgenic plants would change traditional means of production and inoculation of vaccines，and the cost of vaccine production would be reduced greatly. The epidemic of tuberculosis makes it necessary that the new and more effective vaccines for immunoprophylaxis of anti-*tuberculosis* should be developed. Consequently，it is very significant to develop transgenic plant vaccines. In the report，ESAT-6 gene was modified by PCR，the Kozak sequence was placed upstream of the start codon of ESAT-6 gene and KDEL sequence was added to the end of the gene. The modified gene was integrated into a binary vector pBI121. Then ESAT-6 gene with 35S promoter and NOS terminator was excised from pBI121/E-6 to construct plant expression plasmid with pCAMBIA1300. The plant expression plasmid pCAMBIA1300/E-6，which contains hygromycin photransferase gene（HYT） as selection marker，was transferred into *Agrobacerium tumefaciens* EHA105. Papaya's leaves were infected with *Agrobacerium tumeaciens* pCAMBIA1300/E-6/EHA105，and calli were screened on medium containing hygromycin. 15 hygromycin-resistant plants were regenerated through somatic embryogenesis from embryogenic calli，7 of

---

* 通讯作者：周鹏教授，博士生导师，主要从事植物生物反应器领域的研究
联系电话：0898－66890687，E－mail：zhqtw@public.hk.hi.cn

收稿日期：2002－08－10，2002－11－07接受发表

作者简介：张更林（1972－）男，硕士，现在山东医学科学院工作。

which transgenic plants were identified by PCR, and ESAT-6 gene had been integrated into genomes of 4 transgenic papayas by Southern blot analysis. ESAT-6 gene expression in 4 transgenic plants was further analysised by RNA dot blot. These transgenic plants will provide new material for the development of edible vaccines for anti-*tuberculosis*.

Key words: Transgenic papaya; ESAT-6 gene; Oral vaccine

结核病（Tuberculosis）是由结核分支杆菌（*Tuberculosis mycobacterium*）引起的一种慢性传染病，是传染病中死亡率最高的疾病之一。目前，结核病在世界范围内有重新泛滥之势，预防结核病的唯一可用疫苗卡介苗防治效果并不理想，迫切需要开发新型的抗结核有效疫苗。随着现代免疫学的研究和新型疫苗的开发，利用疫苗免疫防治传染病取得了可喜的成果，尤其是亚单位疫苗、多肽疫苗及核酸疫苗的研制成功为预防传染病提供了新的有效免疫途径，也为抗结核有效疫苗的研究提供了新思路。目前，科学家们已从结核分枝杆菌培养物的过滤液中分离出几十种蛋白质，并发现数种蛋白质具有良好的抗结核免疫原性，如：Ag85（A、B、C），MPT51，MPT64，ESAT-6，TB10.4，CFP-10 等（Colditz 等，1994；Morten Harboe 等，1996；Skjøt 等，2002）。由结核杆菌分泌蛋白质的基因构建的多种 DNA 疫苗已被证明具有卡介苗类似的抗结核免疫保护作用（Lowrie 等，1997；TangheA 等，1999）。这些为利用结核杆菌分泌蛋白研制抗结核新型疫苗，探索预防结核病的新方法、新途径提供了研究基础。1992 年 Chatles J. Arntzen 和 Hugh S. Madon 提出了用转基因植物生产疫苗的新思路。1997 年，在 FDA 的批准下，Manson 等人进行了人类历史上第一例食物疫苗人体试验，获得了令人鼓舞的结果。植物疫苗的研究是当前的研究热点，众多的研究成果展示了植物疫苗诱人的应用前景。本研究选择结核杆菌分泌蛋白 ESAT-6 基因转化热带水果番木瓜，以期获得 ESAT-6 基因的转基因植株，为抗结核新型疫苗的研究提供一种新材料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

结核杆菌分泌蛋白 ESAT-6 基因由美国食品和药物管理署疫苗评审和研究中心李忠明博士赠送。植物材料为番木瓜（*Carica Papaya* L.）穗中红品种，由周鹏研究员提供。植物转化受体材料选用抗环斑病毒（*Papaya Ringspot Virus*，PRSV）的穗中红转基因植株的组培苗。

1.2 实验方法

1.2.1 ESAT-6 基因植物表达载体的构建

（1）ESAT-6 基因的修饰改造　为了提高 ESAT-6 基因在植物中的表达，根据发表的基因序列设计了 1 对引物。在引物的 5′端引入了 BamH I 酶切位点和按 Kozak 规则引入有利外源基因表达的“CCACC”序列，在 3′端引入了 Sac I 酶切位点和内质网滞留信号 KDEL 四小肽：

P1：5′－AC GGA TCC CCACC ATG ACA GAG CAG CAG TGG－3′
BamH I　Kozak

P2：3′－G TGA CCC TAC AAG CGT TTT CTA CTC GAT ATC CTC GAG CA－5′
K　D　E　L　Stop　Sac I

利用上述引物，以 ESAT-6 克隆载体为模板进行 PCR，回收约 310bp 的扩增产物，命名为 E-6；将 PCR 产物与 pEGM-T 载体连接，转化大肠杆菌感受态细胞，筛选阳性菌株，酶切和测序鉴定。

(2) 构建 pBI121/E-6 中间表达载体　pBI121 载体含有 CaMV35S 启动子，利用 BamH I 和 Sac I 切除 GUS 基因，插入 E-6 片段，转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞，在含有卡那霉素（50 μg/ml）的 LB 培养基上筛选重组菌落，以 BamH I 和 Sac I 进行重组子鉴定。

(3) pCAMBIA1300/E-6 植物表达载体的构建　利用 Hind Ⅲ和 EcoR I 将 pBI121 上的 35S 启动子、E-6 基因和 NOS 终止子一同切下，插入 pCAMBIA2300 载体的 Hind Ⅲ和 EcoR I 位点，转化 *E. coli* DH5α，酶切鉴定重组体。方法同 1.2.1 (2)。整个构建过程见图 1。

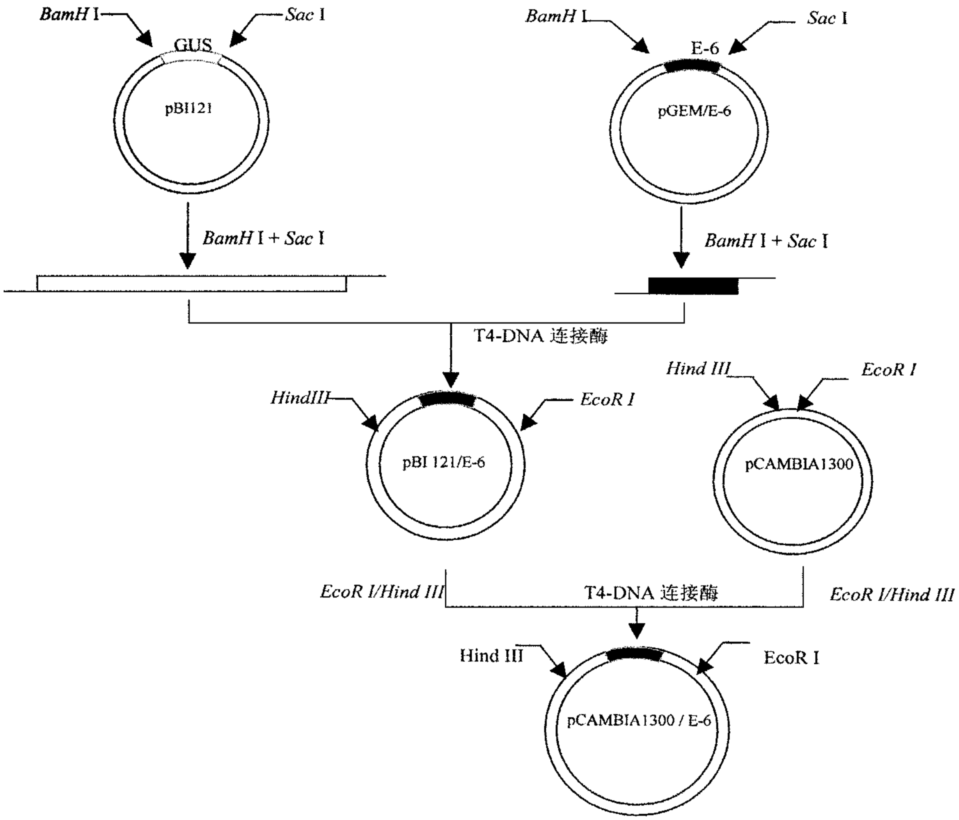

图 1　pCAMBIA2300/E-6 重组载体的构建示意图

Fig. 1　The Construction of pCAMBIA2300/E-6 Recombinant

1.2.2　农杆菌工程菌株的构建

利用 $CaCl_2$ 法对农杆菌株 EHA105（Str.^{r}/Rif.^{r}）制备感受态细胞，采用直接转化法（王关林等，1998）将 pCAMBIA2300/ E-6 表达载体转化农杆菌菌株，在有 Kan 50 μg/ml、Rif 25 μg/ml、Str 25 μg/ml 的固体 LB 培养基平板上筛选重组子；挑取单菌落，28℃，200 r/min 振荡培养，提取农杆菌质粒，斑点杂交鉴定阳性农杆菌工程菌（王关林等，1998），使用 Boehringer Mannheim 公司的 DIG-DNA Labeling and Detection Kit 进行探针标记及杂交，筛选获得的阳性农杆菌株用于转基因植物转化。

1.2.3　植物基因转化

(1) 叶盘法转化　具体方法参见文献（周鹏等，1993），利用潮霉素作为选择压。

(2) 抗性愈伤组织筛选及植株诱导再生　将共培养过的番木瓜组织叶盘转移到含有 25 mg/L 潮霉素、300 mg/L 羧苄青霉素和 200 mg/L 头孢霉素的 M_1 选择培养基（M_1：1/2MS + B_5 生长物质 + BA0.5 mg/L +

NAA1.0 mg/L + Glu. 200 mg/L + 酪蛋白水解物（CH）500 mg/L + 蔗糖 40 g/L + 琼脂 7.5 g/L，pH5.8）上，转接 4 ~ 5 次后，选择生长较紧密、淡绿色、颗粒状紧密的抗性愈伤组织，接种在 M_2 分化培养基（M_2：1/2MS + B_5 生长物质 + KT0.5 mg/L + NAA1.0 mg/L + Glu. 200 mg/L + 酪蛋白水解物（CH）500 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7.5 g/L，pH5.8，不加潮霉素选择压）上诱导出不定芽。将诱导再生的不定芽接种到附加有 25 mg/L 潮霉素的 M_3 培养基（M_3：1/2MS + B_5 生长物质 + BA0.2 mg/L + KT0.3 mg/L + NAA0.1 mg/L + GA31.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7.5 g/L，pH5.8）上进行壮苗培养；当转化植株生长至 2 ~ 3 cm 左右时，转接到含有 25 mg/L 潮霉素的 M_4 培养基（M_4：1/2MS + KT0.2 mg/L + IBA0.5 – 1.0 mg/L + 活性炭（AC）2 g/L + 蔗糖 15 g/L + 琼脂 7.5 g/L，pH5.7）上诱导生根；将根系生长良好的转化植株植入砂盆培养。

1.2.4 转基因植株的鉴定分析

（1）利用 PCR 和 PCR-Southern blot 技术鉴定转基因植株　采用改良 CTAB 法提取转化植株的总 DNA，以此为模板进行 PCR，热循环为 94℃变性 5min；94℃变性 30s；72℃退火 30s；72℃延伸 30s；30 个循环后，72℃延伸 10min；琼脂糖凝胶电泳分析。将 PCR 产物作琼脂糖电泳后，进行 Southern 印迹转移、杂交，方法见文献（王关林等，1998）。

（2）Southern blot 检测　用 BamH I 与 Sac I 酶切 1.2.4（1）中检测出的阳性转化番木瓜的总 DNA，进行 Southern 印迹转移及杂交，方法见文献（王关林等，1998）。

1.2.5 RNA dot blot 检测

采用异硫氰酸胍法（王关林等，1998）提取 Southern Blot 检测呈阳性的番木瓜转基因植株总 RNA。按文献（赵志英等，1998）方法制备 RNA 样品和杂交膜，杂交探针同 Southern blot，杂交、显色方法见文献（王关林等，1998）。

2 结果与分析

2.1 pCAMBIA1300/E-6 植物表达载体的构建结果

为了构建 pCAMBIA1300/E-6 植物表达载体，选用 pBI121 为中间载体，根据 ESAT-6 基因两端的酶切位点，通过 PCR、T – 载体克隆和 BamH I/Sac I 酶切鉴定，能从克隆载体上切下约 300bp DNA 带，说明 pGEM-T/E-6 克隆载体构建成功，基因测序结果亦表明已按预期设计对 ESAT-6 基因进行了正确的改造。

对 pBI121/E-6 作 BamH I 和 Sac I 酶切鉴定，表明阳性重组子中 E-6 基因已经定向克隆到 pBI121 中，用 Hind III 和 EcoR I 酶切 pBI121/E-6 重组质粒，可得到 1500bp 左右的 DNA 片段，证明 E-6 基因已经取代了 GUS 基因。用 Hind III 和 EcoR I 酶切鉴定 pCAMBIA1300/E-6 重组载体，能切下 1500bp 左右的基因片段，说明 E-6 已定向克隆于 pCAMBIA1300 载体中。

2.2 农杆菌工程菌株的构建结果

在含有 Kan（50 μg/ml）、Rif（25 μg/ml）和 Str（25 μg/ml）的选择培养基上筛选重组的农杆菌工程菌株。挑取 6 个单菌落，摇菌提取质粒进行斑点杂交鉴定，结果表明得到了与阳性对照相同的显色斑，这证明已获得 E-6/pCAMBIA1300/EHA105 农杆菌工程菌株。

2.3 抗性愈伤组织的筛选结果

经农杆菌侵染及经共培养的番木瓜外植体，在 M_1 选择培养基上，大部分能诱导出愈伤组织，而对照（未侵染的番木瓜外植体）生长受到抑制，继续培养会褐化死亡，番木瓜外植体诱导出的愈伤组织大多数生长膨松，仅少数外植体能够诱导出良好的愈伤组织。选择结构较紧密、颗粒状、生长势旺盛的抗性愈伤组织，接种在不加潮霉素的 M_2 培养基上

进行不定芽诱导。

2.4　转基因植株诱导再生和分子检测结果

抗性愈伤组织在 M_2 培养基上培养 6～8 周则诱导出不定芽，生根培养（含 Hyg. 25 mg/L）获得完整的植株。本研究对获得的 13 株番木瓜转化植株进行了 PCR 检测，有 7 株番木瓜转化植株能扩增出约 300bp 的 DNA 带（图 2），PCR-Sorthern blot 结果显示均为阳性（图 3）。对移栽成活的 4 株进行 Southern blot（图 4），结果表明对照（番木瓜非转化植株）未出现杂交信号，而这 4 株转基因植株出现了较强的杂交信号，这表明 E-6 基因已整合于转基因番木瓜的核基因组中。

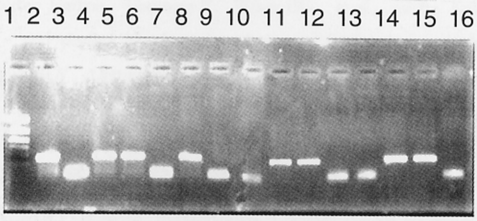

图 2　番木瓜转化植株的 PCR 检测结果

1. PCR Maker（1534bp，994bp，697bp，515bp，377bp，237bp）；2. pCAMBIA/E-6 PCR 扩增结果（阳性对照）；3. 非转基因植株的 PCR 扩增结果；4－16. 为抗性转化植株的 PCR 扩增结果。

Fig. 2　PCR analysis of transgenic *Papaya*

1. PCR Maker；2. pCAMBIA/E-6 plasmid DNA used as positive control；3. non-transformed plant used as negative control；4－16. indivial Papaya with kanamycin resistance.

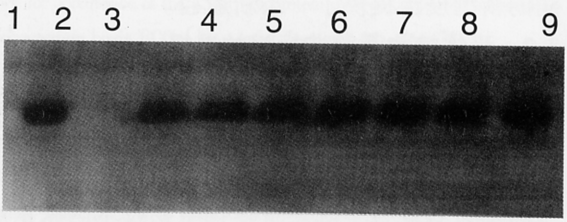

图 3　转基因植株的 PCR-Southern blot 检测结果

1. 质粒 pCAMBIA/E－6，2. 非转基因番木瓜；3－9. 转化番木瓜植株.

Fig. 3　The results of PCR-Southern for the transgenic Papaya

1：pCAMBIA/E-6；2：Non-transgenic Plant；3－6：Ttransgenic Plants

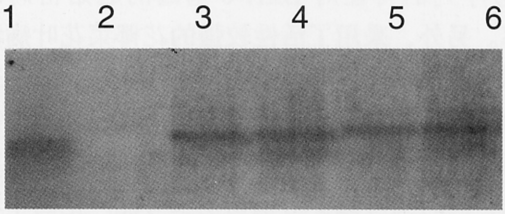

图 4　Southern blot 检测结果

1. 质粒 pCAMBIA/E-6/BamH I＋Sac I 样品；2. 非转基因番木瓜总 DNA/BamH I＋Sac I 样品；3－6. PCR-Southern blot 检测阳性的转化植株的总 DNA/BamH I＋Sac I 样品.

Fig. 4　Southern blot Analysis of transgenic Papaya

1：pCAMBIA/E－6/BamH I＋Sac I；2：Non-transgenic Plant；3－6：Ttransgenic Plants

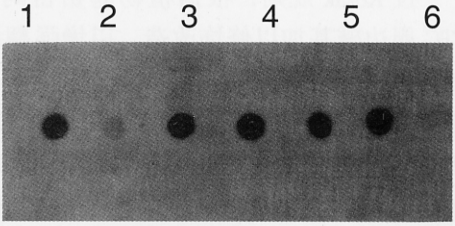

图 5　RNA dot blot 分析

1. pCAMBIA1300/E-6；2. 非转基因植株；3－6. 转基因植株

Fig. 5　RNA dot blot Analysis

1：pCAMBIA1300/E-6；2：Non-transgenic Plant；3－6：Transgenic Plants

2.5　RNA dot blot 检测结果

对 Southern blot 检测阳性的 4 株转基因植株进行 RNA dot blot 检测的结果见图 5，结果表明被检植株均出现了明显的杂交信号，说明这 4 株转基因植株在 RNA 水平均获得了表

达，这为进一步研究蛋白质的表达及免疫分析奠定了物质基础。

3 讨论

3.1 结核杆菌转基因植物口服疫苗的研究

由于移民、人类免疫缺陷病毒（HIV）感染、耐多药性等原因，结核病这个渐渐被人淡忘的古老瘟疫正卷土重来。而现在仍使用于预防结核病的疫苗是已用了50多年的卡介苗，且其免疫保护效果不是很理想。因此，人们正努力寻求新型、有效的抗结核疫苗。利用转基因植物表达结核杆菌分泌蛋白，为进一步研究转基因植物口服疫苗和研制预防结核病的新型疫苗提供了一条新途径。

3.2 受体植物及筛选标记的选择

本研究选用转PRSV-CP基因的番木瓜作为再转化材料是因为：(1）番木瓜享有“万寿果”的美称，是人们喜爱吃的果菜兼用的热带植物，其蛋白含量高，包含的“木瓜酶”对人体有促进消化、预防肠道疾病和抗衰老作用，是理想的转植物口服疫苗受体植物；(2）中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室植物基因工程疫苗研究室主任周鹏研究员获得了抗Kan的转PRSV-CP基因的番木瓜转基因植株，并建立了一套完善的番木瓜再生–转化体系（周鹏等，1993)；(3）以前的研究发现虽然在培养基中附加较高浓度的Kan，但还是获得较高频率的假阳性转化植株，而番木瓜对潮霉素极其敏感，附加较低浓度的潮霉素就可抑制非转化芽或植株的生长，这大大降低了抗性株的假阳性率。因此本研究以pBI121/E-6作为中间载体，将E–6转移至pCAMBIA1300中，构建了潮霉素抗性标记的植物表达载体pCAMBIA1300/E-6，这既避开了原转基因材料中Kan抗性标记，又可以获得抗病毒（PRSV）的ESAT-6转基因植株，给进一步的开发应用奠定良好的基础。

3.3 ESAT-6基因的修饰

按Kozak规则，根据植物起始密码子周边序列的特征对ESAT-6基因的起始密码子ATG周边碱基加以修饰改造，以增强翻译效率。另外，采用了活性较强的花椰菜花叶病毒35S启动子驱动ESAT-6基因的表达，并在3′端引入了内质网滞留信号KDEL序列，以期提高蛋白表达量。对于口服疫苗的开发最理想的是利用组织特异性表达启动子，使外源蛋白在可生食部位特异表达，这样可避免组成型表达启动子控制下，疫苗基因在转基因植物所有部位和所有发育阶段都会表达所造成的浪费，同时又可减少对植物生长可能产生的不利影响（侯丙凯等，2001)。因此，我室今后将把利用番木瓜开发植物口服疫苗的工作重点放在番木瓜果实特异表达研究上。

3.4 关于ESAT-6转基因植株

本研究对13株抗性植株进行了PCR检测，有6株没有扩增出目的条带，可能是在诱导芽分化的过程中去除了潮霉素选择压，使嵌合体中的非转化细胞形成了芽原基。所以，在抗性愈伤诱导芽分化的过程中最好选用低浓度的选择压力。由于自然因素，在移栽过程中7株PCR阳性植株成活4株，其Southern blot检测结果表明这4株皆为ESAT-6的番木瓜转基因植株，RNA dot blot检测表明该目的基因在转基因植株中已经得到稳定表达，进一步的工作是进行ESAT–6在植物体中的表达量和表达产物的免疫活性分析。同时，本文作者正在对获得的转基因植株子一代进行遗传方式研究。

〔参 考 文 献〕

Colditz GA，Brewer TF，Berkey CS，*et al*，1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis：meta analysis of the published literature ［J］. *JAMA*，**271**：698—702

Hou BK（侯丙凯），Xia GM（夏光敏），Chen ZH（陈正华），2001. Strategies for optimizing expression vectors used in plant genetic engineering ［J］. *Hereditas*，**23**（5）：492—497

Lowrie DB，Silva CL，Colston MJ，*et al*，1997. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine ［J］. *Vaccine*，**15**：834—838

Morten Harboe，Oettinger T，Wiker HG，*et al*，1996. Evidence for occurrence of the ESAT－6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG ［J］. *Infect Immun*，**64**：16—22

Skjøt RLV，Oettinger T，Rosenkrands I，*et al*，2000. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies of the ESAT－6 family as immunodominant T-cell antigens ［J］. *Infect Immun*，**68**：214—220

Tanghe A，Lefevre P，Denis O，*et al*，1999. Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosghate transport receptors ［J］. *J Immunol*，**162**：1113—1119

Wang GL（王关林），Fang HJ（方宏筠），1998. The Technology and Principle of Plant Genetic Engineering ［M］. Beijing：Science Press，195—232

Zhou P（周鹏），Zheng XQ（郑学勤），1993. Agrobacterium-mediated PRSV-CP gene transformation in *Papaya* ［J］. *Chinese Journal of Tropical Crops*，**14**（2）：73—77

Zhao ZY（赵志英），Zhou P（周鹏），Zeng XS（曾宪松），*et al*，1998. Ribozyme gene transformation in *Papaya* ［J］. *Chinese Journal of Tropical Crops*，**19**（2）：20—25